

REC'D 03 SEP 1999

PCT/JP 99/03837

日本特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

16.07.99

EJKU

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1998年 7月16日

出願番号

Application Number:

平成10年特許願第202366号

出願人

Applicant(s):

東市郎
住友製薬株式会社
林昭

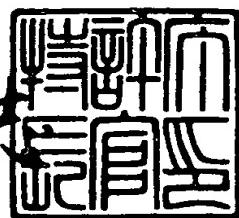
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 8月 5日

特許長官
Commissioner,
Patent Office

佐山 建志



出証番号 出証特平11-3055016

【書類名】 特許願
【整理番号】 132489
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 A61K 35/74
【発明の名称】 細菌の菌体成分を有効成分とする安定化凍結乾燥製剤
【請求項の数】 10
【発明者】
【住所又は居所】 札幌市南区真駒内上町5丁目3番2号
【氏名】 東 市郎
【発明者】
【住所又は居所】 茨木市蔵垣内1丁目3番45号 住友製薬株式会社内
【氏名】 濱松 典郎
【発明者】
【住所又は居所】 茨木市蔵垣内1丁目3番45号 住友製薬株式会社内
【氏名】 藤永 稔夫
【特許出願人】
【識別番号】 592028019
【氏名又は名称】 東 市郎
【特許出願人】
【識別番号】 000183370
【氏名又は名称】 住友製薬株式会社
【代理人】
【識別番号】 100107629
【弁理士】
【氏名又は名称】 中村 敏夫
【電話番号】 06-466-5214
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 056546
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9710701

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 細菌の菌体成分を有効成分とする安定化凍結乾燥製剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 細菌の菌体成分、油状物質、界面活性剤及び安定化剤を含み、以下の特徴を有する水中油型エマルションを凍結乾燥処理して得られる安定化凍結乾燥製剤：

- (a) 油滴中に、細菌の菌体成分を含み
- (b) 単一ピーク型の粒子径分布で油滴が水溶液中に分散し、
- (c) 水溶液中の油滴の粒子径分布及び、濁度の変化が大きくないものである

【請求項2】 水溶液の濁度の変化が凍結乾燥前の濁度の50%以下である請求項1記載の安定化凍結乾燥製剤。

【請求項3】 細菌の菌体成分がBCG-CWSであり、油状物質がスクワランである請求項1、2に記載の安定化凍結乾燥製剤。

【請求項4】 安定化剤がアミノ酸またはウレアである請求項1から3に記載の安定化凍結乾燥製剤。

【請求項5】 安定化剤がグリシンである請求項1から3に記載の安定化凍結乾燥製剤。

【請求項6】 細菌の菌体成分、油状物質、界面活性剤及び安定化剤を含み、以下の特徴を有する水中油型エマルションを凍結乾燥処理することからなる安定化凍結乾燥製剤の製造法：

- (a) 油滴中に、細菌の菌体成分を含み
- (b) 単一ピーク型の粒子径分布で油滴が水溶液中に分散し、
- (c) 水溶液中の油滴の粒子径分布及び、濁度の変化が大きくないものである

【請求項7】 水溶液の濁度の変化が凍結乾燥前の濁度の50%以下である請求項1記載の安定化凍結乾燥製剤の製造法。

【請求項8】 細菌の菌体成分がBCG-CWSであり、油状物質がスクワランである請求項6、7記載の安定化凍結乾燥製剤の製造法。

【請求項9】安定化剤がアミノ酸またはウレアである請求項6から8に記載の安定化凍結乾燥製剤の製造法。

【請求項10】安定化剤がグリシンである請求項6から8に記載の安定化凍結乾燥製剤の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、免疫賦活作用を有する細菌の菌体成分、油状物質、界面活性剤、賦形剤、安定化剤等から構成される安定な乳化製剤の凍結乾燥製剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

微生物死菌、細菌の細胞壁骨格成分 (Cell Wall Skeleton、以下、CWSと略す)、ムラミルジペプチド (M DP)、リポ多糖 (L P S)、マンナン、グルカンおよびこれらの誘導体等の免疫賦活作用を有する細菌の菌体成分（場合によつては組換えDNA法により產生されるものを含む）は、免疫刺激作用を有し、例えば実験的腫瘍系およびヒト癌の免疫療法において抗腫瘍活性を示すことが知られている。しかも、菌体成分が、ホモジナイザー等の分散・乳化機により油状物質中に分散され、さらに、界面活性剤溶液にて乳化されて水中油型エマルションに製剤化された場合に、上記、免疫賦活作用に伴う抗腫瘍効果や感染防御効果がよく発揮されることが知られている (Cancer Res., 33, 2187-2195(1973)、J. Nat. Cancer Inst., 48, 831-835(1972)、J. Bacteriol., 94, 1736-1745(1967)、Gann, 69, 619-626(1978)、J. Bacteriol., 92, 869-879(1966))。

【0003】

しかしながら、従来公知の上記製剤は水中油型エマルションであるため、製剤的には準安定状態であり、経時的な変化が大きく、いずれは油相、水相の2相に分離することになる。そこで通常では、エマルションの安定化のために、①微粒子化、②分散媒と分散質の比重差を小さくする、③高分子などを添加し分散媒の粘度を上昇させる、等の方法が採られている。しかし、いずれも、変化に要する

時間を延長するのみで、最終的には油相、水相の2相に分離する。

特に、従来公知のエマルション（乳化）製剤の場合、CWSを含有することによるエマルションの不安定化が認められ、数日で不溶性凝集物の生成が確認されるようになるため、今まで用時調製によって乳化製剤を調製する以外に方法がなかった。このような用時調製の製剤では恒常的な安定生産は不可能であり、医薬品としての実用化が困難であった。また、この点を解消するために、糖アルコールや糖類を用いた凍結乾燥製剤化の試みが行われている（特開昭63-1291号）が、この先行技術の製剤品でも、凍結乾燥直後および1ヶ月程度の保存で平均粒子径、粒度分布の変化が大きく認められ、実用化に耐えうる安定性の大幅な改善は達成されていなかった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、従来、用時調製以外に調製が不可能であった乳化製剤に、安定化剤を加えて凍結乾燥化することによって、経時的に優れた保存安定性を有する凍結乾燥製剤を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、銳意研究を重ねた結果、上記乳化製剤を安定に凍結乾燥でき、保存安定性を向上させるための好適な安定化剤を発見し本発明を完成するに至った。すなわち、本発明の乳化製剤の凍結乾燥製剤は、水等の適当な分散溶媒による再分散を行った場合、凍結乾燥前と同程度の平均粒子径、粒子径分布あるいは濁度（相対吸光度）を保持することができる。また、本発明の凍結乾燥製剤を、例えば、50℃の過酷な条件下で数ヶ月保存した後、同様に水等の適当な分散溶媒による再分散した場合でも、凍結乾燥前と同程度の平均粒子径、粒子径分布あるいは濁度（相対吸光度）を保持することができる。

【0006】

これらの知見に基づき、本発明の要旨は次のように示される。

（1）細菌の菌体成分、油状物質、界面活性剤及び安定化剤を含み、下記の特徴を有する水中油型エマルションを凍結乾燥処理して得られる安定化凍結乾燥製剤

- (a) 油滴中に、細菌の菌体成分を含み
- (b) 単一ピーク型の粒子径分布で油滴が水溶液中に分散し、
- (c) 水溶液中の油滴の粒子径分布及び、濁度の変化が大きくないものである

(2) 水溶液の濁度の変化が凍結乾燥前の濁度の50%以下である上記(1)記載の安定化凍結乾燥製剤。

(3) 細菌の菌体成分がBCG-CWSであり、油状物質がスクワランである上記(1)、(2)記載の安定化凍結乾燥製剤。

(4) 安定化剤がアミノ酸またはウレアである上記(1)から(3)に記載の安定化凍結乾燥製剤。

(5) 安定化剤がグリシンである上記(1)から(3)に記載の安定化凍結乾燥製剤。

(6) 細菌の菌体成分、油状物質、界面活性剤及び安定化剤を含み、下記の特徴を有する水中油型エマルションを凍結乾燥処理することからなる安定化凍結乾燥製剤の製造法：

- (a) 油滴中に、細菌の菌体成分を含み
- (b) 単一ピーク型の粒子径分布で油滴が水溶液中に分散し、
- (c) 水溶液中の油滴の粒子径分布及び、濁度の変化が大きくないものである

(7) 水溶液の濁度の変化が凍結乾燥前の濁度の50%以下である上記(6)記載の安定化凍結乾燥製剤の製造法。

(8) 細菌の菌体成分がBCG-CWSであり、油状物質がスクワランである上記(6)、(7)記載の安定化凍結乾燥製剤の製造法。

(9) 安定化剤がアミノ酸またはウレアである上記(6)から(8)に記載の安定化凍結乾燥製剤の製造法。

(10) 安定化剤がグリシンである上記(6)から(8)に記載の安定化凍結乾燥製剤の製造法。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明の第1の態様は、免疫賦活作用を有する菌体成分、油状物質、界面活性剤、安定化剤等よりなる水中油型エマルションを凍結乾燥処理して得られる安定なガン免疫療法用凍結乾燥製剤である。

【0008】

本発明における免疫賦活作用を有する菌体成分としては、微生物死菌や微生物由来のCWS、ムラミルジペプチド(MDP)、リポ多糖(LPS)、マンナン、グルカンおよびこれらの誘導体等が挙げられる。微生物死菌の例としては、ヒト型結核菌の死菌等が挙げられる。CWSの由来微生物としては、マイコバクテリア属、ノカルディア属、コリネバクテリア属、プロピオニバクテリウム属等が挙げられる。中でも好ましいものとして、マイコバクテリア属ウシ型結核菌であるBCGを挙げることができる。これらのCWSは、物理的に細菌を粉碎した後、除核酸、除タンパク、脱脂などの精製工程を経て得られる不溶性残渣として得られ、その製法自体は公知である(J.Nat.Cancer Inst.,52,95-101(1974))。

なお、菌体成分の濃度は、乳化製剤時において0.1~10mg/mlになるように使用されることが好ましい。

【0009】

本発明における油状物質としては、Immunology,27,311-329(1974)に記載されているような鉱物油、動植物油が挙げられる。鉱物油としては、流動パラフィン、バイオール(Bayol F)、ドラケオール(Drakeol)-6VR等が挙げられる。植物油としては、落花生油、ゴマ油、AD-65(落花生油とアラセルとアルミニウムモノステアレートの混合物)等が挙げられる。動物油としては、スクワラン、スクワランのようなテルペノイド誘導体等が挙げられる。中でも好ましいものとしては、ドラケオール6VR、スクワランを挙げることができる。

なお、油状物質の濃度は、0.01~30%w/wの範囲が適当であるが、0.01~10%w/wが好ましく、0.01~5.0%w/wがより好ましい。

【0010】

本発明における界面活性剤としては、医薬品製剤に使用される界面活性剤であれば特に制限されるものではない。例えばリン脂質、非イオン性界面活性剤等を

挙げることができる。リン脂質としては、ホスファチジルアミン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、スフィンゴミエリン、レシチン等を挙げることができる。また、水素添加されたリン脂質も使用することができる。非イオン性界面活性剤としては、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン共重合体、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油誘導体、ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート(ポリソルベート20)、同モノパルミテート(ポリソルベート40)、同モノステアレート(ポリソルベート60)、同モノオレート(ポリソルベート80)等のポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類およびソルビタンモノラウレート(Span20)、同モノパルミネット(Span40)、同モノステアレート(Span60)、同モノオレート(Span80)等のソルビタン脂肪酸エステル類等を挙げることができる。好ましい界面活性剤としては、卵黄ホスファチジルアミン、卵黄レシチン、大豆レシチン、ポリソルベート80を挙げができる。より好ましいものとして、ポリソルベート80を挙げができる。

なお、界面活性剤の濃度は、0.01~10%w/wの範囲が適當であるが、0.01~5.0%が好ましい。これら界面活性剤は一種類に限らず、適宜、數種類を組み合わせて使用することができる。

【0011】

本発明における安定化剤としては、多糖類、アミノ酸、タンパク質、ウレア、塩化ナトリウムが挙げられる。多糖類としては、デキストラン、でんぶん、マルトデキストリン、セルロース、ポリビニルピロリドン、アルギン酸ナトリウム等が好ましいものとして挙げられる。アミノ酸としては、アラニン、グリシン、プロリン等の中性アミノ酸が好ましく、より好ましい中性アミノ酸としては、グリシンを挙げができる。タンパク質としては、アルブミン、ゼラチン、コラーゲン等が好ましいものとして挙げられる。これら安定化剤は一種類に限らず、適宜、数種類を組み合わせて使用することができる。

なお、安定化剤の濃度は、0.1~20%w/wの範囲が適當であるが、0.1~10%w/wが好ましい。

【0012】

本発明で使用される分散溶媒は、エマルション粒子の分散媒体となるものであり、注射用水（注射用蒸留水）、生理食塩水などが挙げられるが、注射可能な分散溶媒であれば特に限定されない。

【0013】

本発明では、凍乾ケーキを形成するために必要に応じ賦形剤を添加することができる。また、賦形剤は等張化剤としての役割を兼ねる場合が多い。賦形剤としては、糖類、アミノ酸、ウレア、塩化ナトリウム等が好ましいものとして挙げられる。糖類としては単糖類、二糖類、糖アルコールが挙げられる。単糖類としては、グルコース、フルクトース等、二糖類としては、マルトース、ラクトース、トレハロース、スクロース等、糖アルコールとしては、マンニトール、ソルビトール等が挙げられる。アミノ酸としては、アラニン、グリシン等を挙げることが出来る。これら賦形剤は一種類に限らず、適宜、数種類を組み合わせて使用することができる。

なお、賦形剤の濃度は、0.1～30%w/wの範囲が適當であるが、1～20%w/wが好ましい。

その他、医薬品製剤に使用しうる酸化防止剤、防腐剤、等張化剤、緩衝剤等を必要に応じて添加することができる。添加濃度としては10%w/w以下で十分な場合が多い。

【0014】

本発明の凍結乾燥製剤は、凍結乾燥前及び、再分散後の水中油型エマルションにおいて、単一ピーク型の粒子径分布を示し、濁度（相対吸光度）変化が大きくないものが好ましく、凍結乾燥前の濁度の50%以下の変化であることがより好ましい。また、平均粒子径が0.1～20μmの範囲に存在するものであり、好ましくは、平均粒子径が1～10μmであるものであり、より好ましくは平均粒子径が1～5μmであるものである。

尚、平均粒子径、粒子分布、濁度は例えば静的光散乱粒度分布測定装置（SALD3000、島津製作所社製、以下同じ）を使用して測定することができる。

【0015】

本発明の第二の態様は、本発明に係る安定な乳化凍結乾燥製剤の製造法である。その製造法としては、まず、凍結乾燥前に免疫賦活作用を有する菌体成分、油状物質、界面活性剤、賦形剤、安定化剤等からなる水中油型エマルションを調製する。係る水中油型エマルションは、例えば、前記濃度の油状物質に同じく前記濃度の免疫賦活作用を有する菌体成分を添加し、さらに界面活性剤、賦形剤、安定化剤及びその他の添加剤の水溶液を添加した後、例えばPotter-Elvehjem型ホモジナイザー、ホモミキサー、超音波ホモジナイザー、マイクロフルイダイザー（商品名）、ナノマイザー（商品名）、アルティマイザー（商品名）、マントンガウリンホモジナイザー型高圧ホモジナイザー等の分散、乳化機により、前記平均粒子径を有する水中油型エマルションになるまで乳化処理を施す。製造上の都合によっては、水中油型エマルションを調製後、賦形剤、安定化剤等の添加剤を添加しても良い。

次いで、得られた水中油型エマルションを凍結乾燥処理を行い、最後に通常はバイアル内部を窒素置換し、打栓を行い凍結乾燥製剤を得る。

【0016】

本発明の凍結乾燥製剤は、水等の適当な分散溶媒の添加により速やかに再分散し、凍結乾燥前と同程度の平均粒子径、粒子径分布あるいは濁度を有する水中油型エマルションを再構築することができる。分散溶媒の液量は、用途によって特に制限はないが、凍結乾燥前の液量の0.5～2倍量の範囲であればよい。

本発明の凍結乾燥製剤は、水等の適当な分散溶媒による再分散したものを、注射など非経口で投与できる。投与形態は、治療目的などにより異なり、特に制限されるものではない。非経口的に投与する場合、通常用いられる投与形態として例えば、皮下、皮内に投与することができる。

投与量、投与回数は対象とする疾患、患者の症状、年齢、体重、性別等によつて異なるが、非経口投与する場合、特に注射剤として使用する場合には、通常は成人に対して週1回若しくは4週1回の投与で1回当たり10～250μgの範囲、好ましくは25～200μgの範囲を投与することができる。

【0017】

【実施例】

以下、実施例、参照例、試験例を挙げて、本発明をさらに詳しく説明するが、本発明がこれらによってなんら限定されるものではない。

【0018】

実施例1

菌体成分としてマイコバクテリア属BCG菌由来のCWS (BCG-CWS) 4mgを油状物質としてスクワラン 20μL (0.5%w/w) にPotter-Elvehjem型ホモジナイザーを用い分散し、その後、0.2%w/w ポリソルベート80/300mM (2.3%w/w) グリシン水溶液 4mLを添加し乳化することで免疫賦活作用を有する水中油型エマルションを得た。

この水中油型エマルションを4mLバイアルに0.5mLずつ分注し凍結乾燥を行って本発明の凍結乾燥製剤を得た。凍結乾燥は、共和式凍結乾燥機 (G-1、共和真空社製) を用いて行った。

【0019】

実施例2

安定化剤にウレアを用い菌体成分、油状成分及びそれらの量、方法は実施例1と同様にして、水中油型エマルション及びその凍結乾燥製剤を得た。

【0020】

参照例1

安定化剤に先行技術（特開昭63-1291号）記載の糖アルコールであるマンニトールを用い、菌体成分、油状成分及びそれらの量、方法は実施例1と同様にして、水中油型エマルション及びその凍結乾燥製剤を得た。

実施例1、2及び参照例1で用いた構成成分、量を表1に示す。

【0021】

【表1】

	実施例1	実施例2	参照例1
菌体成分	マイコバクテリア属BCG 菌由来のCWS(BCG-CWS) 4 mg	マイコバクテリア属BCG 菌由来のCWS(BCG-CWS) 4 mg	マイコバクテリア属BCG 菌由来のCWS(BCG-CWS) 4 mg
油状成分	スクワラン 20 μL (0.5%w/w)	スクワラン 20 μL (0.5%w/w)	スクワラン 20 μL (0.5%w/w)
界面活性剤及び安定化剤	0.2%w/w ポリソルベート 80/300mM(2.3%w/w)グリシン水溶液 4 mL	0.2%w/w ポリソルベート 80/300mM(2.3%w/w)ウレア水溶液 4 mL	0.2%w/w ポリソルベート 80/300mM(2.3%w/w)マンニトール水溶液 4 mL

【0022】

実施例1、2及び参照例1で得られた凍結乾燥前の水中油型エマルションと凍結乾燥直後再分散して得られた水中油型エマルションの吸光度、平均粒子径、粒子径分布を、静的光散乱粒度分布測定装置（SALD3000、島津製作所社製、以下同じ）により測定した。凍結乾燥直後の再分散水中油型エマルションは、それを注射用蒸留水0.5 mLにより再分散したものである。結果を表2に示す。

【0023】

【表2】

	平均粒子径		粒度分布 変化*	吸光度（相対値） 凍結乾燥直後／凍結乾燥前
	凍結乾燥前	凍結乾燥直後		
実施例1	2.7 μm	2.6 μm	A	0.95
実施例2	2.1 μm	2.5 μm	A	0.90
参照例1	2.6 μm	2.8 μm	B	0.15

*：粒度分布変化評価判定 A=粒度分布変化小、B=粒度分布変化あり

【0024】

安定化剤にグリシンを用いた実施例1、ウレアを用いた実施例2では、図1および図2で示されるように凍結乾燥前後を比較した場合、平均粒子径、粒子径分布にほとんど変化が無く凍結乾燥前の水中油型エマルションを復元することができた。また、吸光度にも差異が見られず、濁度の変化はほとんどなかった。

安定化剤に先行技術(特開昭63-1291号)に記載されている糖アルコールであるマンニトールを用いた参照例1では、図3に示されるように単一ピーク型の粒子径分布が崩れてしまい、吸光度でも差異が見られた。

【0025】

試験例1 生物活性試験

実施例及び参照例に記載の製剤を水により再分散した水中油型エマルションについて、マウス腫瘍転移モデル系により生物活性を比較し、凍結乾燥処理により係る製剤の生物活性が低下しないことを確認した。

8週齢のBALB/Cマウス20匹の尾静脈より 2.5×10^4 個/匹のColon26-M3.1腫瘍細胞を投与し、1群5匹の4群に分けた。24時間後、第1群は、何も投与せずコントロールとした。第2群は、BCG-CWSを含まない以外は実施例1と同じ水中油型エマルション100μLを等量の0.2%ポリソルベート80/300mMグリシン水溶液で希釈したサンプルを尾静脈より投与した。第3群は、実施例1に記載の凍結乾燥処理前の水中油型エマルション100μLを等量の0.2%ポリソルベート80/300mMグリシン水溶液で希釈したサンプルを尾静脈より投与した。第4群は、実施例1の凍結乾燥製剤を、注射用蒸留水0.5mLで再分散して得られる水中油型エマルション100μLを等量の0.2%ポリソルベート80/300mMグリシン水溶液で希釈したサンプルを尾静脈より投与した。2週間後、開胸し、肺を摘出した後、肺に転移した腫瘍巣数を計数し比較を行った。結果は表3に示すとおりである。

【0026】

【表3】

	転移抑制率(%) (対対照群1)
第1群(コントロール)	—
第2群(BCG-CWS不含製剤)	0
第3群(実施例1:凍結乾燥前のエマルジョン製剤)	52*
第4群(実施例1:凍結乾燥製剤)	51*

* : $p < 0.01$ 、第1群との比較によるt-検定を実施。

凍結乾燥前後で生物活性の低下は認められず、本発明の凍結乾燥製剤の有用性が示された。

【0027】

試験例2 安定性試験1(比較実験)

実施例1で得られた本発明の凍結乾燥製剤及び参照例1で得られた凍結乾燥製

剤を50℃、25℃で保存後2週間、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月後再分散した水中油型エマルションを相対吸光度にて測定し、濁度変化を経時的に比較した。結果は、表4、表5および図4、図5に示すとおり、本発明の凍結乾燥製剤はいずれの温度においての長期保存後も凍結乾燥前と同程度の値を示しており優れた安定性を示した。

【0028】

【表4】

50℃における長期保存結果（相対吸光度）

	凍結乾燥前	凍結乾燥後	50℃×2W	50℃×1M	50℃×2M	50℃×3M
実施例1	1.00	0.95	0.95	0.98	1.02	0.98
参照例1	1.00	0.37	0.26	0.27	-"	-"

【0029】

【表5】

25℃における長期保存結果（相対吸光度）

	凍結乾燥前	凍結乾燥後	25℃×2W	25℃×1M	25℃×2M	25℃×3M
実施例1	1.00	0.95	0.96	0.93	0.95	0.98
参照例1	1.00	0.37	0.21	0.21	-"	-"

**：検出限界値以下のため測定不能

試験例3 安定性試験2（粒子径分布変化測定実験）

実施例1で得られた本発明の凍結乾燥製剤を、5、25、50℃で保存し、1ヶ月後、3ヶ月後に再分散し、平均粒子径、粒子径分布の変化を経時的に調べた。結果は表4、図6、7、8に示すとおりである。

【0030】

【表6】

保存温度	平均粒子径（μm）			
	凍乾前	凍乾直後	1M	3M
5℃	2.7	2.6	2.2	2.3
25℃	2.7	2.6	2.2	2.4
50℃	2.7	2.6	2.4	2.6

本発明の凍結乾燥製剤は5、25、50℃いずれの温度においても、その平均粒子径、粒子径分布の顕著な変化を示さず、優れた安定性を示した。

【0031】

試験例3 安定性試験3（粒子径分布変化測定実験）

参照例1で得られた係る凍結乾燥製剤を、25、50℃で保存し、1ヶ月後再分散し、平均粒子径、粒子径分布の変化を調べた。結果は表7、図9に示すとおりである。

【0032】

【表7】

保存温度	平均粒子径 (μm)		
	凍乾前	凍乾直後	1M
25℃	2.6	2.8	1.9
50℃	2.6	2.8	1.4

先行技術(特開昭63-1291号)に安定化剤として記載されている糖アルコールであるマンニトールを使用した場合、25℃、50℃いずれも、1ヶ月で平均粒子径、粒子径分布に顕著な変化が認められた。

【0033】

【発明の効果】

本発明によって提供される凍結乾燥製剤は、長期に安定な製剤であり、水等の適当な分散溶媒により再分散することで、抗腫瘍活性を維持した乳化製剤(水中油型エマルション)を調製して治療に供することができるようになった。従って、本発明の凍結乾燥製剤はガンの治療上有効な抗腫瘍効果や感染防御効果等を免疫誘導できるものであり、含有される免疫賦活作用を有する菌体成分の効能の範囲で用いることができ、患者自身の免疫力を高めることができる。その結果、癌、感染症等の治療に有効な治療剤または予防剤として用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は実施例1によって得られた水中油型エマルションを凍結乾燥前と凍結乾燥直後再分散したものの平均粒子径、粒子径分布を示したものである。

【図2】

図2は実施例2によって得られた水中油型エマルションを凍結乾燥前と凍結乾燥直後再分散したものの平均粒子径、粒子径分布を示したものである。

【図3】

図3は参考例1によって得られた水中油型エマルションを凍結乾燥前と凍結乾燥直後再分散したものの平均粒子径、粒子径分布を示したものである。

【図4】

図4は安定性試験1において得られた50℃で保存したものの濁度（相対吸光度）の経時的な変化を示したものである。

【図5】

図5は安定性試験1において得られた25℃で保存したものの濁度（相対吸光度）の経時的な変化を示したものである。

【図6】

図6は安定性試験2において、50℃で保存したものの平均粒子径、粒子径分布の経時的な変化を示したものである。

【図7】

図7は安定性試験2において、25℃で保存したものの平均粒子径、粒子径分布の経時的な変化を示したものである。

【図8】

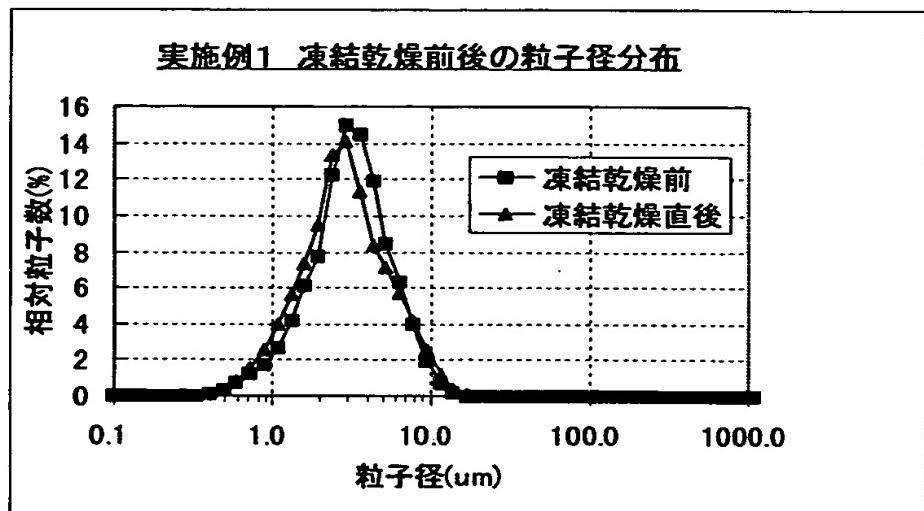
図8は安定性試験2において、5℃で保存したものの平均粒子径、粒子径分布の経時的な変化を示したものである。

【図9】

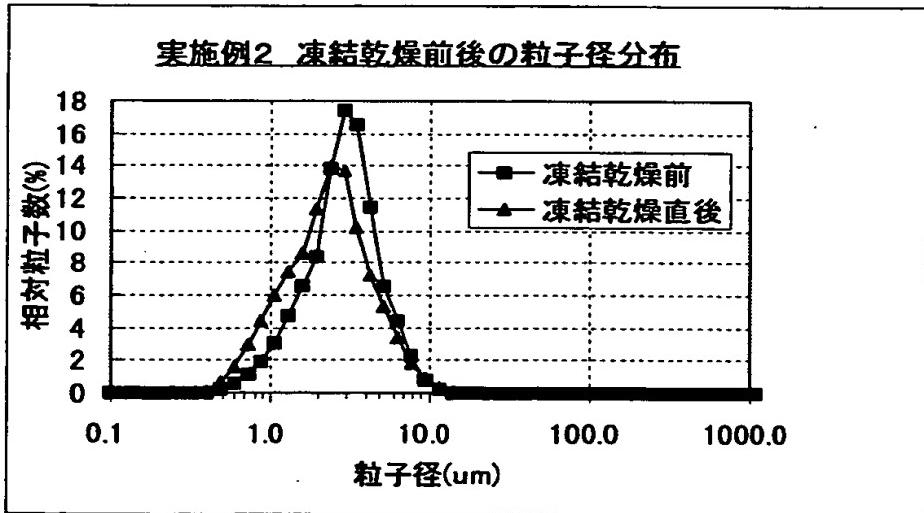
図9は安定性試験3において得られた結果の平均粒子径、粒子径分布の経時的な変化を示したものである。

【書類名】 図面

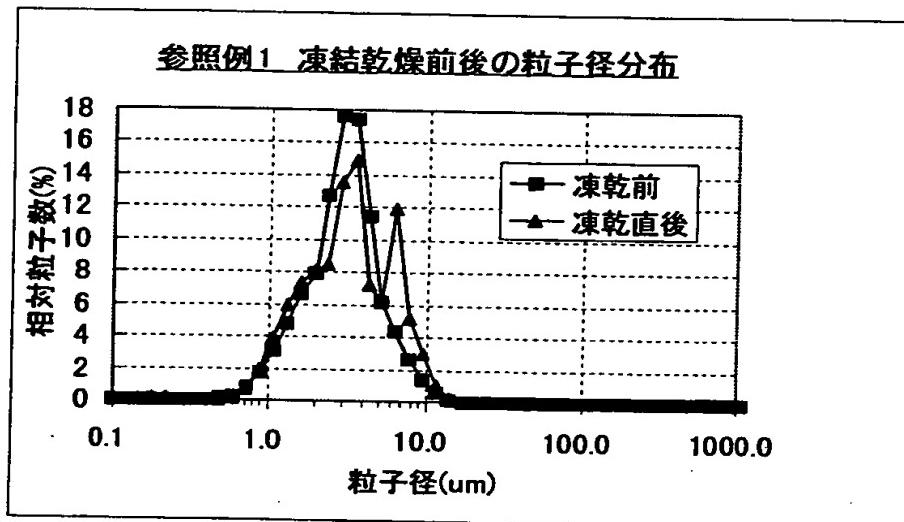
【図1】



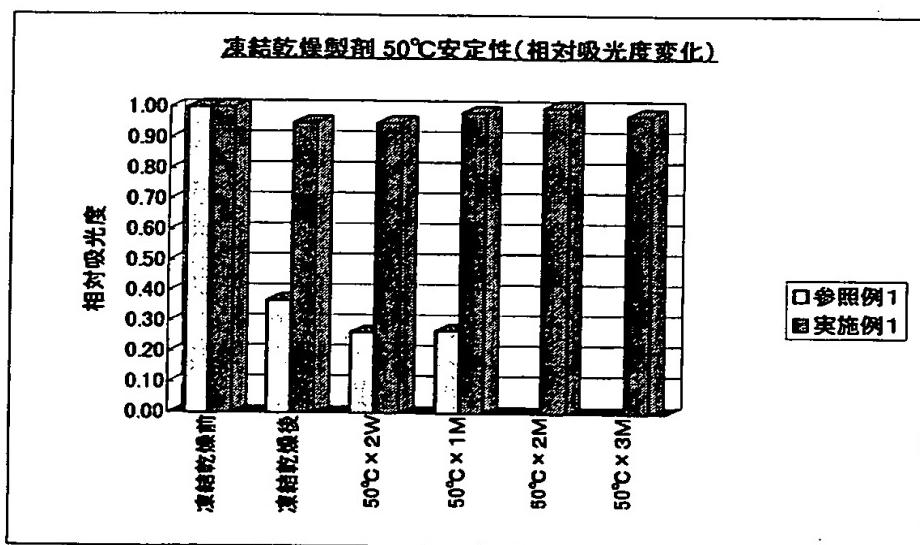
【図2】



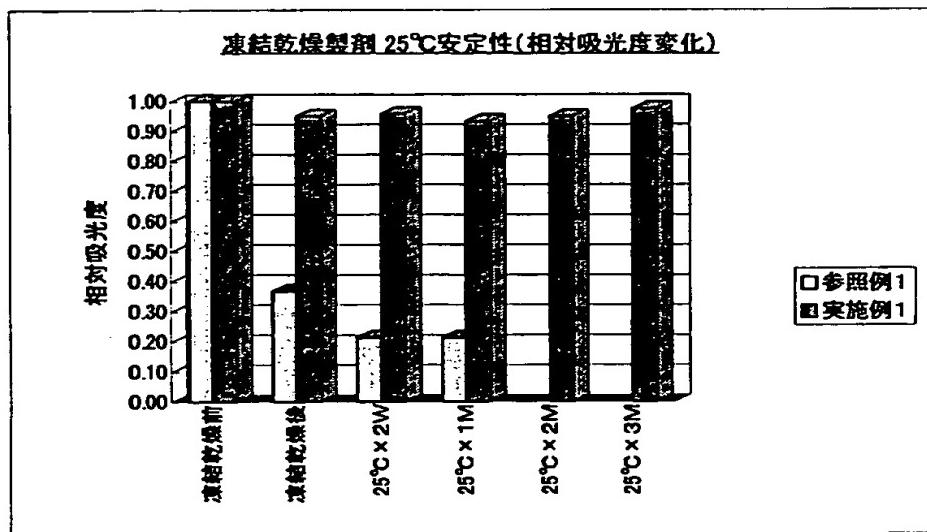
【図3】



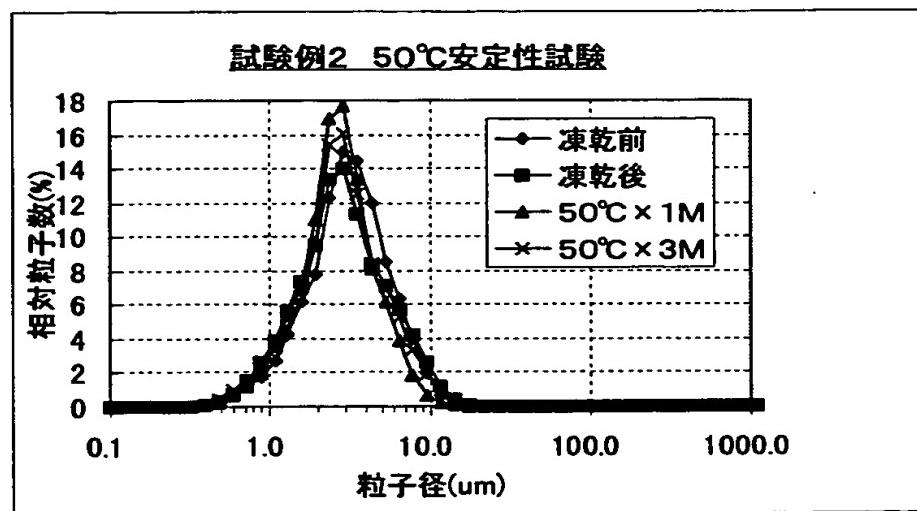
【図4】



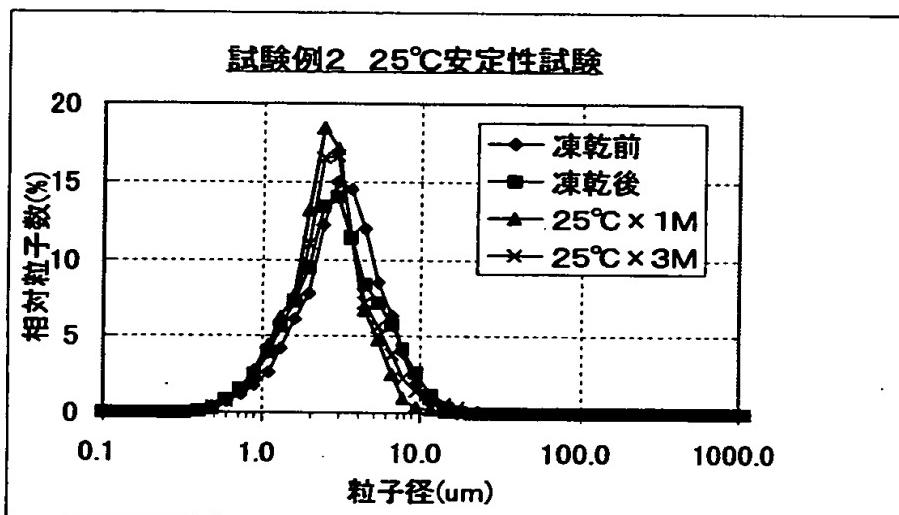
【図5】



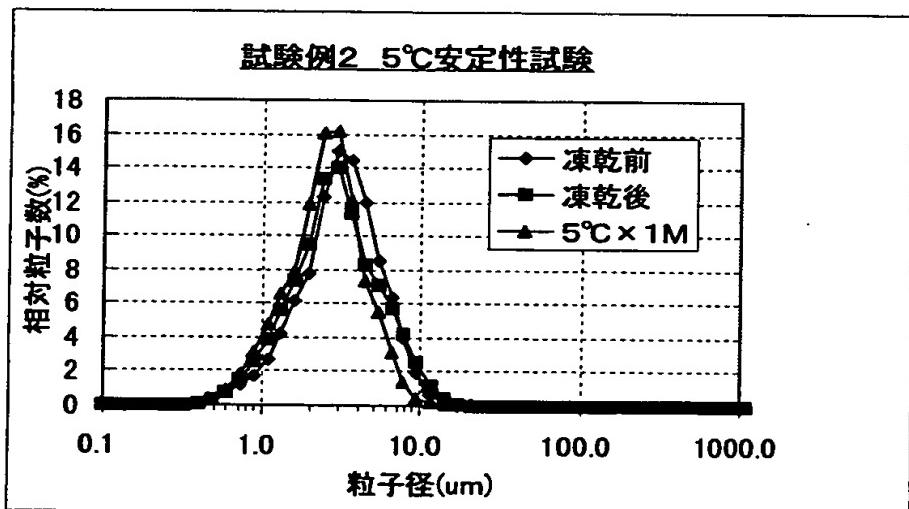
【図6】



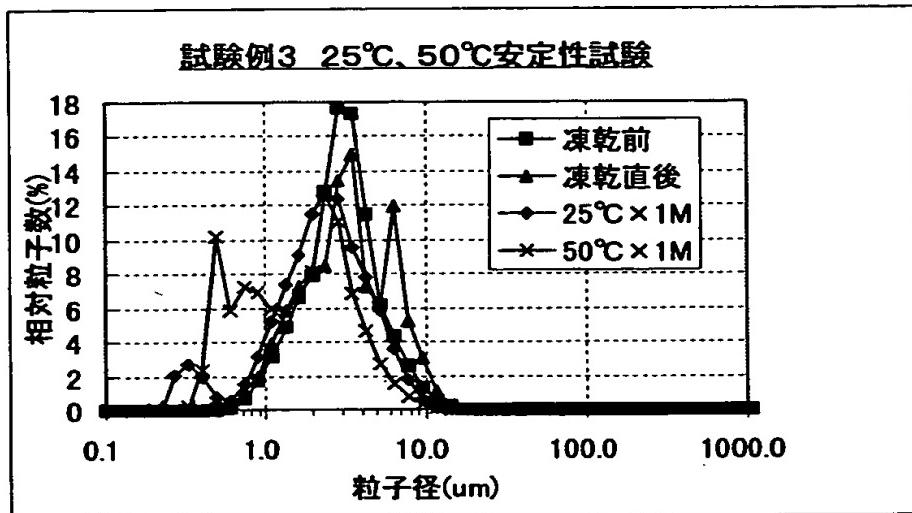
【図 7】



【図 8】



【図9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 免疫賦活作用を有する菌体成分を含有することからなる、癌免疫療法用安定化凍結乾燥製剤を提供する。

【解決手段】 安定化剤として、アミノ酸、ウレア等を用いることにより、凍結乾燥処理に安定なだけでなく、長期保存安定性にも優れた凍結乾燥乳化製剤を得ることができた。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成10年 7月16日
【特許出願人】
 【識別番号】 592028019
 【住所又は居所】 北海道札幌市南区真駒内上町5丁目3番2号
 【氏名又は名称】 東 市郎
【特許出願人】
 【識別番号】 000183370
 【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号
 【氏名又は名称】 住友製薬株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100107629
 【住所又は居所】 大阪府大阪市此花区春日出中三丁目1番98号 住
 【氏名又は名称】 友製薬株式会社 法務部内
 中村 敏夫

【書類名】出願人名義変更届

【あて先】特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】平成10年特許願第202366号

【承継人】

【識別番号】597032387

【氏名又は名称】林 昭

【提出物件の目録】

【物件名】権利の承継を証明する書面 1

29818900554



譲渡証書

平成ノ〇年 九月 30 日

住所 大阪府吹田市津雲台3丁目9番5号
譲受人 林 昭 殿

住所 札幌市南区真駒内上町5丁目3番2号
譲渡人 東 市郎 

住所 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号
譲渡人 住友製薬株式会社
代表者 横塚 實亮 

下記の発明に関する特許を受ける権利の一部を貴殿に譲渡したことに相違ありません。

記

1. 特許出願番号 平成10年特許願第202366号

2. 発明の名称 細菌の菌体成分を有効成分とする安定化凍結乾燥製剤

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 出願人名義変更届

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成10年 9月30日
【承継人】 申請人
【識別番号】 597032387
【住所又は居所】 大阪府吹田市津雲台3丁目9番5号
【氏名又は名称】 林 昭
【提出された物件の記事】
【提出物件名】 権利の承継を証明する書面 1

出願人履歴情報

識別番号 [592028019]

1. 変更年月日 1991年12月27日
[変更理由] 新規登録
住 所 北海道札幌市南区真駒内上町5丁目3番2号
氏 名 東 市郎

出願人履歴情報

識別番号 [000183370]

1. 変更年月日 1990年 8月 9日

[変更理由] 新規登録

住所 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

氏名 住友製薬株式会社

出願人履歴情報

識別番号 [597032387]

1. 変更年月日 1997年 3月 7日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府吹田市津雲台3丁目9番5号
氏 名 林 昭